

⑬ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-246201

⑨ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)10月2日

A 01 N 1/02

7215-4H

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全10頁)

⑭ 発明の名称 臓器保存用溶液

⑯ 特 願 昭63-329506

⑰ 出 願 昭63(1988)12月28日

優先権主張 ⑱ 1987年12月29日 ⑲ 米国(US) ⑳ 139,530

⑳ 発 明 者 フォルカート オー. アメリカ合衆国 53705 ウィスコンシン マデイソン  
ベルザー サウス ハイランズ アベニュー 6105

㉑ 発 明 者 ジェームズ エツチ. アメリカ合衆国 53705 ウィスコンシン マデイソン  
サザード サウス ヒル ドライブ 5202

㉒ 出 願 人 ウィスコンシン アラ アメリカ合衆国 53705 ウィスコンシン マデイソン  
ムナイ リサーチ フ ノース ウォルナット ストリート 614  
オンデーション

㉓ 代 理 人 弁理士 川崎 隆夫 外1名

明 係 田 智

## 1. 発明の名称

臓器保存用溶液

## 2. 特許請求の範囲

(1) 約320 mOsm/lの溶液オスモル濃度を有し、

実質的にエチレングリコール、エチレンクロロヒドリン、塩化ナトリウム及びアセトンを含む含有せず、約150,000から約350,000ダルトンの分子量を有するヒドロキエチル澱粉5重量%を含む含有する薬学的に許容し得る貯蔵溶液を含んでなる内移植を必要とする患者の内移植向けの臓器の保存及び貯蔵用溶液。

(2) 澱粉が約50,000ダルトン未満の分子量を有するヒドロキエチル澱粉を実質的に含有しない請求項1記載の溶液。

(3) 細胞生存能力維持用電解質を含む含有する請求項2記載の溶液。

(4) ラクトビオン酸塩を含む含有する請求項3記載の溶液。

(5) ラフィノースを含む含有する請求項4記載の溶液。

(6) 約320 mOsm/lの溶液オスモル濃度を有し、実質的にエチレングリコール、エチレンクロロヒドリン、塩化ナトリウム及びアセトンを含む含有せず、約150,000から約350,000ダルトンの分子量を有するヒドロキエチル澱粉5重量%を含む含有する溶液を用いて臓器をフラッシングすること及び

該臓器を患者に内移植するまで該溶液中で貯蔵すること、

を含む内移植を必要とする患者の内移植向けの臓器の保存及び貯蔵方法。

(7) 溶液中の澱粉が約50,000ダルトン未満の分子量を有するヒドロキエチル澱粉を実質的に含有しない請求項6記載の方法。

(8) 溶液が細胞生存能力維持用電解質を含む含有する請求項7記載の方法。

## 特開平1-246201(2)

(9) 溶液がアトピオン酸塩を含有する請求項8記載の方法。

(10) 溶液がラフィノースを含有する請求項9記載の方法。

(11) 溶液がグルタチオンを含有する請求項10記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は臓器保存用溶液に関するものである。

(従来の技術及び発明が解決すべき課題)

腎臓保存、死体腎臓の生体外貯蔵は比較的新しい分野である。移植用死体腎臓の保存は病院で通常実施されているが、進歩は試行錯誤による実験に限られていた。この研究は臨床的見地からは一部成功していたけれども、これら成功のかけにある真実の原理はよく理解されていない。

腎臓移植は厳密な研究操作から進展し末期段階の腎臓疾患に対する確立した臨床療法となってきたので、腎臓保存は研究室での研究段階から確立された臨床方法へと進歩してきた。現在、腎

臓も、現在用いられているすべての腎臓保存ユニットはこれらの基本的原理を共有している。臨床移植における連続灌流法にはいくつかの利点がある。灌流の第一の利点は死体からの移植を部分的に選択操作するのに十分な時間が得られることである。第二は移植前の生活能力試験を可能にすることである。もし保存時間を現在の混合リンパ球培養試験に必要とされる5～7日にまで延長できるならば、死体からの腎臓移植の結果に対し重要な改善がなされることが期待できる。

最初の細胞内電解質溶液によるフラッシング後の単純冷却貯蔵又は電解質タンパク質溶液による脈動灌流によって人間の腎臓を2～3日間成功裡に保存できるようになって贈与者及び受納者の組織対比試験、移植センター間の腎臓分配、受納者の注意深い予備手術準備のために十分な時間が得られるようになり、予備的な贈与者の培養の時間が得られる結果となり、移植前の贈与腎臓の血管の補修時間が得られるようになった。低温沈殿したプラズマによる低温脈動灌流を用いて72時

間保存に最も一般的に用いられている二つの方法は単純低温(hypothermic)貯蔵法と連続灌流(perfusion)である。臨床的な腎臓保存の最も一般的である単純低温貯蔵では、死体贈与者から臓器を取り出し急速冷却する。この方法は中心部温度をできるかぎり迅速に下げるため通常外部冷却と短時間灌流の組み合わせで行われる。次いで腎臓が貯蔵され、簡単なプラスチック容器中のフラッシング・アウト(flush-out)溶液中に浸漬され、容器を水中に浸漬し0～4℃の温度に保持される。この方法の利点はその単純性、低コスト、及び内蔵移植の容易性にある。最適保存を行うためのフラッシング・アウト溶液の組成について広範囲に及ぶ研究が行われてきた。

臨床試験と共に広大な研究室調査研究が行われてきた腎臓保存の第二の方法は連続脈動灌流法である。連続灌流法の基本的な構成要素は(1)脈動流、(2)低温化、(3)膜酸化及び(4)アルブミン及び脂質の両方を含有する灌流液(perfusate)である。多少の変形はあるけれど

間保存した腎臓は人間の腎臓保存の重要な進歩であることを証明し、保存の好ましい方法であった。水冷した細胞内電解質フラッシング液処理後の単純冷却貯蔵による腎臓器官の保存法は人間の腎臓保存に61時間まで満足に用いられていた。

血清アルブミンは種々の形で必要なコロイド浸透圧を作るため臨床上的臓器保存に広く用いられている。血清アルブミンの形としては低温沈殿したプラズマ、プラズマタンパク質画分、人間の血清アルブミン及びシリカゲル処理プラズマが含まれる。しかしながら、これらの灌流液は天然由来物質から調製されるので、変動は避けられない。もし合成コロイドを含有する灌流液が入手できれば特に有利であろう。

過去において、多数の合成コロイド物質が腎臓保存における有効性について実験的に試験されてきた。これらのコロイドにはデキストラン、ポリビニルピロリドン、ブルロニック類、ヒドロキシエチル澱粉(HES)、フィコール(Ficoll)、ア

## 特開平1-246201(3)

ラビアルブミン、ポリエチレングリコールが含まれる。これらのうち血清アルブミンほど有効なものはない。しかしながら、HESは24時間の保存、ある場合には72時間の保存に有効であった。これらのコロイド物質はすべて含塩水を基調とする灌流液中で試験された。最近、コロイド浸透支持用人間の血清アルブミン(HSA)の塩素の代わりにグルコン酸アニオンを含有する灌流液で犬の腎臓を72時間うまく保存できることが観察された。

1960年代のおそくに2つの重要な研究、すなわち、腎臓が冷温貯蔵により30時間(1)及び連続灌流により72時間もの間(2)安全に保存できたことが示された。これら2つの研究は死体腎臓の臨床的移植を緊急操作から半選択操作へと変えた。多くの研究者が他の冷温貯蔵溶液について試験し(3)、何人かが48又は72時間の保存に成功したと主張した(3-5)。しかしながらコリンズ(Collins)溶液又は変性ユーロコリンズ(Eurocollins)溶液(5)が腎臓を冷温貯蔵

器冷却及び臓器取り出し後の冷温貯蔵の両方に用い得る保存用溶液が望ましい。

(課題を解決するための手段)

本発明によれば、人間の血清アルブミンの代りに特殊な合成HESを含有する灌流液もしくは貯蔵用溶液及びそれを用いる臓器保存方法が開示される。適切な組成物が提供される。開示されるのはすい臓の72時間保存、腎臓の48時間保存及び肝臓の少なくとも24時間保存に提供された貯蔵用溶液及び灌流液である。

上述したように、血清アルブミン(HSA)に基づく灌流液は過去17年間実験的及び臨床的両方の腎臓保存用として標準であった。不幸にして、この型の灌流液では僅か3日の保存期間しか得られなかった。これら両方の方法では腎臓の生活活性を3日間までは保存するけれども、より長い保存時間を定常的に得るのは困難である。さらにこれらの方法は生存能力を3日間までは保持するけれども、腎臓の移植後の血清クレアチニンのレベルが上昇し、この高いレベルを正常に戻すの

により保存している大部分の移植センターで好まれている。

1980年代に免疫抑制用にシクロスポリン(cyclosporine)が紹介されて他の臓器、特に肝臓、すい臓、心臓、肺臓、及び心肺臓の移植に関する関心が復活した。しかし、腎臓に対して成功した保存法はこれら他の臓器に対しては成功しないことが証明された。従って、心臓、肝臓及びすい臓の臨床的保存は最低限にしか維持されず、6～10時間以上にならなかった。これらの臓器の移植は腎臓の場合よりも数倍複雑であり、手術は常に贈与者の病院で手術室が利用できる夜間に行われている。心臓及び肝臓の保存期間が短いことはまた贈与者用及び受納者用の二つの外科チームを必要としている。これら臓器の保存期間を30時間まで延長することはこれら臓器の移植に対し腎臓移植の場合と同様な衝撃、すなわち、臓器入手可能性の増大、臓器廃棄の減少、臓器配分の増大及びコストの低下をもたらすであろう。

すべての贈与者臓器、贈与者体中その場での臓

に必要な時間が長くなることによって示されるように腎臓が損傷される。初期の灌流液は容易に静脈注入用として入手できる電解質から選ばれ、基本的に細胞外組成物のものであった。

現在まで腎臓保存用に受け入れられる方法は得られていなかった。臨床的な効果が証明された方法は短時間貯蔵(3日間)に限られ、生存能力は大いに低下している。本発明は低体温保存臓器に最も適した灌流液及び貯蔵液の生化学的組成及び大いに改善された長期保存が得られる新規な合成コロイド浸透剤について記載する。

凍結及び連続好気性灌流法は理論的に真の長期間(1月から数年間)保存が得られる唯一の手段である。単純冷温貯蔵は臓器が生活活性を失う特定の時間制限を有している。低体温法は細胞内酵素が臓器の生活活性に必要とされる主要な細胞成分を分解する速度を低下させる。低体温法は代謝を停止させるのではなく、単に反応速度及び細胞の死亡を遅くする。

カルンら、ブリティッシュ・メディカル・

## 特開平1-246201(4)

ジャーナル 1963; 2: 651-655は冷温血液を用いる虚血腎臓の単純冷却は12時間機能が保持されることを示した。コリンズ(ランセット 1969; 2: 1219-1222)は適切な灌流溶液の使用が腎臓の貯蔵時間を関数3に(30時間まで)増加させたことを示した。この溶液がすい臓、肝臓及び心臓など他の臓器保存に有効でなかったのは臓器の特有の代謝の差によると考えられる。

フラッシュ・アウト溶液が適切かつ有効であるためには1)低温化により生じられる細胞膨潤を極小化し、2)細胞内酸性分解を防止し、3)フラッシュ・アウト期間中の細胞外空間の膨張を防止し、4)特に再灌流中の酸素を含有しないラジカルによる害を防止し、5)再灌流中の高エネルギーリン酸塩化合物再生用基質を含む組成を有していなければならない。低温化により生じられる細胞膨潤は水分の蓄積による。この膨潤傾向は細胞に対し不浸透性である基質(不浸透剤)を110~140ミリモル(mmol)(110~140ミリオスモル(mOsm)/kgの浸透圧)添加

ン・ソサイエティ・オブ・トランスプラント・サージョニズ、第13年会、5月28-29日、1987)の貯蔵を改善することを示している。

有効なフラッシュ・アウト溶液は細胞外空間の膨張、贈与者臓器のその場のフラッシング中及び臓器を取り出した後に生じる膨張を防止しなければならない。このような膨張は毛細管系統を圧迫し、組織内へのフラッシュ・アウト溶液の分配を悪くすることになる。大部分の冷温貯蔵溶液はコロイド浸透性体(アルブミン又は他のコロイド)を作用させる基質を含有していない。それ故、フラッシュ・アウト溶液の成分は迅速に細胞外空間に拡散し、組織の水腫を生じさせる。したがって、その場合の理想的なフラッシュ・アウト溶液はコロイド浸透圧をつくる基質を含有すべきであり、そのフラッシュ・アウト溶液の主要成分を細胞外空間を膨張させることなく自由に交換できるものである。

効果的な冷却貯蔵溶液として第四に考慮すべき重要な点は再灌流中の酸素を含有しないラジカル

することにより打ち消すことができる。この不浸透剤の濃度はコリンの冷温貯蔵溶液中のグルコース濃度(120ミリモル)及び他の冷温貯蔵溶液中の不浸透剤の濃度に等しい。したがって、好結果の冷温貯蔵溶液の鍵となる成分は有効な不浸透剤の適切な濃度である。

好結果の冷温貯蔵溶液として第二に考慮すべき重要な点は細胞内酸性分解の防止である。虚血は低温でも解糖及びグリコーゲン分解(バスツール効果)を刺激し、また乳酸の生成及び水素イオン濃度を増大させる。組織の酸性分解は細胞にとって決定的であり、リソソマルの不安定化を生じし、リソソマル酵素を活性化し、ミトコンドリアの性質を変えることになる。それ故、細胞内酸性分解の防止は良好な保存の必要条件である。ある研究では、冷温貯蔵溶液の効果的な緩衝又はアルカリ性pHを有するフラッシュ・アウト溶液の使用が肝臓(リー、ティーエス、トランスプラント・プロス 1984、16: 134-137)及びすい臓(アブストラクト、アメリカ

による害であるが、これらの剤の正確な役割はまだ不明である。内生的キサンチンオキシダーゼはスーパーオキシドアニオンを捕捉するスーパーオキシドディスムターゼの高い内生的活性に比較して低い活性を有しているから、酸素を含まないラジカルは人間の肝臓及び腎臓にはあまり重要ではないと考えられている。これに対し、酸素を含まないラジカルにより生じられる害はそのような損害にたいして敏感な肺臓及び腸にとっては極度に重要である。

考慮すべき最後の重要な点はエネルギー代謝である。アデノシントリフォスフェート(ATP)は低温貯蔵中に急速に分解し、この分解の結果プラズマ膜を自由に浸透できる最終生成物(アデノシン、イノシン及びハイポキサンチン)が形成される。臓器の再灌流にはATPを必要とするナトリウムポンプ活性の急速な再生が必要である。それ故、ATP前駆物質が得られることが効果的臓器保存にとって重要であろう。

腎臓、肝臓及びすい臓の代謝には重要な相違点

## 特開平1-246201(5)

があり、これらの相違点がこれらの臓器がいかによく保存されるかに影響する。細胞膨潤の抑制には有効な不浸透剤が必要である。コリンズ溶液の主要な不浸透剤であるグルコースは肝臓又はすい臓に有効でなく、容易に細胞中に入る。サウザードら、クリオバイオロジイ 1986; 23: 477-482。もう一つの通常用いられる不浸透剤であるマニトールは肝臓ではグルコースと同様に浸透する。このように、グルコース又はマニトールに依存する低温肝臓溶液が肝臓及びすい臓に有効でない理由の一つはこれら溶液が有効な不浸透剤を含んでいないことである。

本発明によれば、臓器保存用溶液は細胞に対する不浸透剤としてラクトビチオン酸アニオンとラフィノースを含有し、約320ミリオスモル(mOsm)/ℓの溶液オスモル濃度(solution osmolality)、120 mMのK<sup>+</sup>及び30 mMのNa<sup>+</sup>を有している。好ましいコロイドは約150,000から約350,000ドルトン(dalton)の平均重量分子量及び約0.4から

約0.7の置換度を有する変性ヒドロキシエチル澱粉である。より好ましいコロイドは約200,000から約300,000ドルトンの平均重量分子量を有するヒドロキシエチル澱粉である。好ましいコロイドは実質的に約50,000ドルトン未満の分子量を有するヒドロキシエチル澱粉を含有しないものである。本発明の1実施態様によれば、ヒドロキシエチル澱粉は蒸留脱イオン水による透析又は他の処理によりヒドロキシエチル澱粉製品の有効性に対し逆効果を有する予め未知の数種の不純物が除去される。透析処理により除去される物質は非常に少量のヒドロキシエチル澱粉であり、残留アセトン及び塩化ナトリウムとともにヒドロキシエチル化の副製品であるエチレングリコール及びエチレンクロロヒドリンを含んでいる。エチレングリコール及びエチレンクロロヒドリンは毒性であることが知られている。したがってそれらの除去は少量存在していても望ましいことである。

好ましい実施態様において保存溶液及び灌流液

組成には次のものが含まれるが、これに特定されるものではない。

第1表

成分	1 ℓ中の量
K <sup>+</sup> - ラクトビチオン酸	100 mmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mmol
MgSO <sub>4</sub>	5 mmol
ラフィノース	30 mmol
アデノシン	5 mmol
グルタチオン	3 mmol
インシュリン	100 U
バクトリム	0.5 ml
デクサメタゾン	8 mg
アロプリノール	1 mM
ヒドロキシエチル澱粉	50 g

分子量約200,000から

約300,000ドルトン

置換度約0.4から0.7

溶液はNaOHにより室温でのpH7.4にし

た。最終的な濃度はNa = 30 + 5 mM、K<sup>+</sup> = 120 + 5 mM、mOsm/ℓ = 320 + 5。バクトリム = トリメトプリン(16 mg/ml) + サルファメトキサゾール(80 mg/ml)。ヒドロキシエチル澱粉は約3~8%の範囲内で存在したはずである。

したがって、本発明は延長された臨床的臓器保存期間を提供し、合成コロイドとして天然由来の物質から調製された灌流液から生じる変動を低減している。

本発明を詳細にかつ好ましい実施態様を特に参照して説明したが、しかしながら、通常の技術を有する当業者にとってその精神と範囲を離れることなく変化が可能であると理解されよう。

## (実施例)

次に本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明する。

## 実施例1

## ヒドロキシエチル澱粉の調製

100 gのヒドロキシエチル澱粉を1 ℓの蒸留

## 特開平1-246201(6)

脱イオン水に溶解し10% w/w溶液をつくった。このHES溶液を50,000ドルトンの分子量を分離する透析バッグ(34mm x 18 inch)に入れ、蒸留脱イオン水10-15ℓの容器の中に入れ72時間攪拌した。水は毎日とり替え、HESを集めて使用するまで-20℃で凍結した。

## 実施例2

## 犬のすい臓の72時間保存

体重15-25kgの成人雑種犬を実験に使用した。

手術操作。麻酔ははじめペンタトール(pentathol)で行ない、ハロタン(halothane)で続けた。中心線切開によりすい臓の左切片(尾部)を前述のように取り出した。ひ臓をつけた移植部分(グラフト)をフラッシュアウト直後(コントロール)、冷蔵48時間後及び冷蔵48時間後にそれぞれ長骨管(ilial vessel)に移植した。すい臓は開けたままにし、すい液を自由に腹腔へ滴下させた。抗凝血剤は使用しなかった。すい臓の右切片は移植の時に除去した。

保存。保存溶液の比較を第1表に示した。摘出後すい臓は約250-300ccのフラッシュ・アウト溶液を高さ60cmからフラッシングした。グラフトは二重プラスチック容器中で保存溶液に浸して入れ、容器を氷水浴中に置いた。

統計処理。学生用T試験法を用い統計的に評価した。得られた値は平均値±SEMである。

## 結果

全ての移植体(グラフト)は移植後、直ちによく灌流した。保存移植体には灌流後5-10分に程度の差はあるが小葉内水腫(intralobular edema)が生じた。全ての場合ひ臓はよく灌流した。第2表に示すように、5匹の犬が死亡した。そのうち3匹はコントロール群、2匹はグループ3(72時間保存)であった。死因は移植とは無関係で、全ての犬はグラフトが機能したまま死亡した。すい臓機能検査の際、全てのグラフトは(コントロールでさえも)ひ臓の場合同様種々の程度の線維症を示した。動脈及び静脈の血栓症はどのグラフトも明らかでなかった。

実験記録。全ての犬に摘出前及び移植後最初の3日間は0.5gのマンドール(Mandol)I.V.を与えた。犬にはビオカーセ(VioKase)含有の標準ドッグフードを給餌した。これら動物は3群(グループ)に分けた。グループ1:臓器摘出、洗浄後直ちにグラフトを移植、グループ2(48時間冷却貯蔵)、グループ3(72時間冷却貯蔵)。血液のグルコース濃度を移植後1週間は毎日、その後は2週に1回測定した。静脈内グルコース許容濃度試験(IVGTT)を移植後24時間、2週間及び4週間に行った。4週間後にグラフトを除去し、その2-3日後にIVGTTを行った。IVGTTにはグルコース(0.5g/体重1kg)を注射し、その後1分、5分、10分、20分、30分、60分、90分に血液グルコースを測定した。5-60分測定から得られた血液グルコース濃度からK値を算出した(9)。グルコース値が2日間をこえ150mg%よりも大きく、K値が1.0よりも低い場合を糖尿病の兆候と考えた。

移植後血液グルコース値及びIVGTT結果は各動物毎に第2表に示した。検討した各グループの平均値(±SEM)も第2表に示した。移植後最初の1週間中の平均血液グルコース値はグループ3が最も高く(124±6mg%)、この値はグループ1(94±7mg%)及びグループ2(107±7mg%)と比較した場合有意差(p<0.05)があった。日数1の平均K値もグループ3(185±0.15%)がグループ1(2.44±0.14%)及びグループ2(2.53±0.22%)と比較した場合有意に(p<0.05)低かった。グループ3において、日数14で試験したK値(1.7±0.1%)及び日数28のK値(1.61±0.19%)は日数1のK値と同等にとどまっていた(P=NS)。グループ1及びグループ2においてK値は低下し、移植後2週間で3グループ間の有意差はなくなった。第4週までは、グループ3のK値はグループ2のそれよりも良かったが、コントロールグループと比較すれば若干低かった(グ

グループ1内の個数が少ないため統計的有意は示されなかった。

全ての犬がすい臓除去後過血糖症（血液グルコース濃度が200mg%より大）となり、移植された臓器がグルコース恒常性に大きく関与していたことを示した。グループ3の4匹は長期間生存が観察された。1匹の犬は移植後7週間に肺炎で死亡したが、正常血糖のままであった。2匹の犬は3月後及び4月後に犠牲にし、1匹の犬は6月間そのままにした。全ての犬に糖尿の徴候はなく、正常血糖であった。

#### 実施例3

##### 24時間肝臓保存

臨床的肝臓保存は約6-10時間に制限されており、これを24時間又はそれ以上に増加させることは肝臓移植に重大な衝撃を与えるであろう。分離し灌流した兎の肝臓を、冷温貯蔵に続くコリンズ溶液、ケンブリッジ血清タンパク質画分（PPF）、マーシャル溶液及び本発明の溶液（保存溶液）それぞれの中での保存特性の評価に

時間内に立ち上がった。血小板数は手術後6時間正常であった。6時間及びそれに続く7日間のビリルビン及び酵素値を表に記録しており、正常肝臓機能の急速な回復を示している。1匹の犬は手術後5日に腸重積症により死亡した。

	6時間	日数1	日数3	日数5	日数7
ビリルビン mg%	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.6	0.9 ± 0.7	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.2
SGOT	2148 ± 983	1835 ± 1145	61 ± 16	55 ± 40	45 ± 21
磷酸7Mμ	186 ± 14	217 ± 47	273 ± 126	311 ± 64	315 ± 48

#### 特開平1-246201(7)

使用した。冷温貯蔵した肝臓の正常温度灌流中での胆汁生産は生活能力の有用なパラメータであり、コントロールと24時間冷温貯蔵した兎の肝臓の胆汁生産速度（ $\text{ml}/100\text{gm}/\text{hr} \pm \text{SD}$ ）を表に示す。

コントロール	5.4 ± 1.7
ケンブリッジPPF	1.8 ± 0.9
ユーロコリンズ	1.9 ± 1.3
マーシャル	3.1 ± 0.5
保存溶液	4.4 ± 0.5

説明保存溶液は他の冷温貯蔵溶液に比べ24時間冷温貯蔵（2-4℃）、正常温度灌流での胆汁生産の点で優れていた。

成功的保存溶液の最終的試験は移植モデルである。それ故、保存溶液を犬の正常肝臓移植モデルに使用した。この溶液を用いる灌流に続いて3匹の犬の肝臓を続けて24-26時間貯蔵した。移植はカフ(cuff)及び縫合技術の組み合わせで行った。すべての肝臓は満足すべき外観を呈しており、3匹の犬は敏捷に起きており、処置終了の4

#### 実施例4

##### 腎臓保存

この経験に基づいて、説明した冷温貯蔵（CS）溶液の腎臓保存に対する潜在的有用性を検討し、再灌流後の腎臓機能に対するその効果を、1）分離し灌流した犬の腎臓モデル（IPK）中で、2）犬のオート移植（autotransplant）モデル中で検討した。

1）犬の腎臓ユーロコリンズ（Eurocollins）（EC）中又は説明した冷温貯蔵溶液（CS）中でそれぞれ48時間冷温貯蔵した。腎臓機能はIPKモデルの再灌流中にクレブス-ヘンゼleit（Krebs-Henseleit）溶液を含有した酸素化変性アルブミンを用い37℃で90分より長い時間測定した。10分ごとに尿サンプルを集め分析した。GFR（クレアチニン除去）、尿/プラズマタンパク質（U/P）及び画分ナトリウム再吸収（%Na）を算出した。結果は平均値としてかっこの標準偏差とともに第3表に示す。

両方の冷温貯蔵腎臓グループは再灌流時に腎臓

機能が低下（コントロール腎臓に比較して）した。FC-貯蔵腎臓に比較してCS-貯蔵腎臓はIPK中にGFR及びナトリウム再吸収性を有意に改善した。この機能改善はCS中で貯蔵された腎臓は冷温イシェミック損傷をEC中で貯蔵された腎臓よりも迅速に回復させることができることを示唆している。

2) 48時間CS中で保存した8匹の犬の腎臓を順次オート移植した。3匹の動物は技術的な複雑さ（動脈血塞、腸重積症）によって犠牲になった。生き残った5匹の移植後血清クレアチニン（平均値±SD）を第4表に示す。

この研究はCS溶液を用い48時間冷温貯蔵した場合腎臓機能がよく保存されることを示している。それ故、この溶液は腎臓、すい臓及び肝臓を保存することができ、単純冷温貯蔵又は連続灌流に使用することができる。

特開平1-246201(8)

手続補正書（自発）

平成元年2月15日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

## 1. 事件の表示

昭和63年特許願第329506号

## 2. 発明の名称

臓器保存用溶液

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 53705

ウイコンシン マディソン ノース

ウォルナット ストリート 614

名称 ウイコンシン アラムナイ

リサーチ フォンデーション

代表者 ジョン アール バイク

国籍 アメリカ合衆国

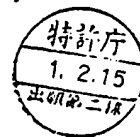
## 4. 代理人 〒105 電話(591)1004

住所 東京都港区虎ノ門1丁目9番2号

虎ノ門東相ビル5階

氏名(7000)弁理士 川崎 隆夫

(ほか1名)



## 5. 補正命令の日付 自発

## 6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

## 7. 補正の内容

(1) 明細書第21ページ最下行の次に下記の「第2表」を加入します。



## 特開平1-246201(9)

第 2 表  
保存後移植すい臓機能

犬 No.	保 存	血液グルコース 第 1 週 (mg%)	K 値 : % IVGTT (1 日)	K 値 : % IVGTT (2 週間)	K 値 : % IVGTT (4 週間)	備 考
グループ 1:						
1	コントロール	72.7±6.2	1.97	2.33	—	27日死亡、胸膜渗出液
2	コントロール	113.1±7.7	2.46	1.73	1.33	
3	コントロール	104.4±16.5	2.65	—	—	5日死亡、腹内腫瘍
4	コントロール	93.9±9.8	2.76	1.82	2.76	
5	コントロール	78.5±16.1	2.38	1.44	—	26日死亡、腸重積症
	平均	93.5±7.0	2.44±0.14	1.81±0.16 <sup>b</sup>	2.05±0.71	
グループ 2:						
6	48時間冷却貯蔵	93.5±5.6	2.76	1.41	—	14日犠牲にする
7	48時間冷却貯蔵	91.1±7.3	2.65	1.92	—	14日犠牲にする
8	48時間冷却貯蔵	108.3±9.9	2.56	2.15	1.11	
9	48時間冷却貯蔵	130.4±10.0	1.78	1.82	1.41	
	平均	106.5±6.6	2.53±0.22	1.83±0.15 <sup>b</sup>	1.26±0.15	
グループ 3:						
10	72時間冷却貯蔵	113.5±11.8	1.47	1.52	2.30	
11	72時間冷却貯蔵	108.7±9.8	1.73	—	—	15日死亡、胸膜渗出液
12	72時間冷却貯蔵	132.9±10.6	1.15	1.30	1.38	
13	72時間冷却貯蔵	105.0±9.1	2.55	2.37	1.68	
14	72時間冷却貯蔵	118.8±5.3	2.02	—	—	5日死亡、明白な理由なし
15	72時間冷却貯蔵	143.2±4.0	2.16	1.97	2.03	
16	72時間冷却貯蔵	150.0±8.1	1.92	1.86	1.15	
17	72時間冷却貯蔵	115.9±11.0	1.77	1.77	1.15	
	平均	123.5±5.9 <sup>a</sup>	1.85±0.15 <sup>a</sup>	1.71±0.18	1.62±0.19	

a (p<0.05) 対グループ 1 及び 2

b (p<0.05) 対 IVGTT 1 日

(2) 明細書第 27 ページ第 17 行の次に下記の

「第 3 表」及び「第 4 表」を加入します。

特開平1-246201 (10)

第 3 表

I P K 分		10	30	60	90
尿 流 量 $\mu\text{L} / \text{分} \cdot \text{g}$	C*	12.93(5.74)	15.15(3.00)	16.00(4.44)	12.06(4.49)
	EC	5.84(1.81)	17.48(8.77)	24.41(11.45)	30.31(19.86)
	CS	2.52(1.67)	6.20(2.45)	6.60(4.79)	10.53(4.23)
G F R $\mu\text{L} / \text{分} \cdot \text{g}$	C*	224.96(88.90)	240.38(30.70)	210.66(57.77)	125.48(31.62)
	EC	8.09(3.07)	29.60(13.60)	38.32(18.53)	37.30(21.68)
	CS	6.98(5.46)	27.23(13.75)	20.06(23.71)	51.53(27.20)
U / P 比	C*	0.09(0.02)	0.10(0.02)	0.12(0.06)	0.09(0.02)
	EC	0.53(0.19)	0.43(0.09)	0.35(0.07)	0.31(0.15)
	CS	0.43(0.02)	0.58(0.16)	0.64(0.22)	0.59(0.23)
N a %	C*	98.91(0.81)	99.15(0.47)	99.05(0.44)	98.81(0.48)
	EC	44.34(4.93)	55.35(8.98)	56.52(0.11)	40.54(20.52)
	CS	64.09(21.78)	85.71(5.76)	86.20(6.76)	87.87(12.28)

\* I P Kにおけるコントロール腎臓

第 4 表

日 数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
血清クレアチン (mg%)	1.3 $\pm 0.2$	3.1 $\pm 0.7$	2.5 $\pm 1.1$	2.4 $\pm 1.0$	2.2 $\pm 0.9$	2.0 $\pm 0.8$	1.6 $\pm 0.5$	1.6 $\pm 0.4$	1.4 $\pm 0.3$	1.4 $\pm 0.3$	1.2 $\pm 0.3$

(以上)